

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-173538

(43)Date of publication of application : 24.06.2004

(51)Int.Cl.

C12N 15/09  
C12N 1/15  
C12N 1/19  
C12N 1/21  
C12N 5/10  
C12N 9/04  
G01N 33/66  
// C12Q 1/54  
(C12N 9/04  
C12R 1:01 )  
(C12Q 1/54  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 2002-341551

(71)Applicant : AMANO ENZYME INC

(22)Date of filing : 25.11.2002

(72)Inventor : SUZUMURA AKITOSHI  
HAMAMATSU NORIO

(54) PYRROLOQUINOLINEQUINONE DEPENDENT GLUCOSE DEHYDROGENASE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a modified pyrroloquinolinequinone-dependent glucose dehydrogenase having low reactivity with maltose, galactose, etc.

SOLUTION: The modified pyrroloquinolinequinone-dependent glucose dehydrogenase has an amino acid sequence of a pyrroloquinolinequinone-dependent glucose dehydrogenase derived from *Acinetobacter calcoaceticus* provided that one or more amino acids in each of the region corresponding to the 1st region composed of the 326th amino acid to the 354th amino acid and the region corresponding to the 2nd region composed of the 278th amino acid to the 320th amino acid of the sequence are replaced with other amino acids.

### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 31.05.2005

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**BEST AVAILABLE COPY**

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-173538

(P2004-173538A)

(43) 公開日 平成16年6月24日(2004.6.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (符号)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 3
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/04 D	4 B O 6 5
審査請求 未請求 請求項の数 21 O L (全 43 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2002-341551 (P2002-341551)  
 (22) 出願日 平成14年11月25日(2002.11.25)

(71) 出願人 000218162  
 天野エンザイム株式会社  
 愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号  
 (74) 代理人 100095577  
 弁理士 小西 富雄  
 (74) 代理人 100100424  
 弁理士 中村 知公  
 (74) 代理人 100114362  
 弁理士 荻野 幹治  
 (72) 発明者 柿村 彰敏  
 岐阜県各務原市須崎町四丁目179番35  
 天野エンザイム株式会社岐阜研究所内  
 (72) 発明者 ▲熊▼松 真郎  
 茨城県つくば市大久保8番地 ノバルティ  
 スファーマ株式会社筑波研究所内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素

## (57) 【要約】

【課題】 マルトースやガラクトースなどに対する反応性が低い改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を提供する。

【解決手段】 対応する野生型酵素のアミノ酸配列を基準として、アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第326番アミノ酸～第354番アミノ酸からなる第1領域に相当する領域、及び第278番アミノ酸～第320番アミノ酸からなる第2領域に相当する領域においてそれぞれ一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてなるアミノ酸配列を有する、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

対応する野生型酵素のアミノ酸配列を基準として、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第326番アミノ酸～第354番アミノ酸からなる第1領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列を有する、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

## 【請求項2】

前記第1領域に相当する領域において二つ以上のアミノ酸が置換されている、請求項1に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

10

## 【請求項3】

前記第1領域内の第342番アミノ酸及び第351番アミノ酸に相当するアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されている、請求項1に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

## 【請求項4】

アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第278番アミノ酸～第320番アミノ酸からなる第2領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項1～3のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

20

## 【請求項5】

前記第2領域内の第295番アミノ酸に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項4に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

## 【請求項6】

アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第162番アミノ酸～第197番アミノ酸からなる第3領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項1～5のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

## 【請求項7】

アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第75番アミノ酸、第168番アミノ酸、及び第347番アミノ酸にそれぞれ相当するアミノ酸からなるグループより選択される一以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項1～6のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

30

## 【請求項8】

アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来である、請求項1～7のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

40

## 【請求項9】

配列番号1のアミノ酸配列において、第326番アミノ酸～第354番アミノ酸からなる第1領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてなるアミノ酸配列を有する、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

## 【請求項10】

前記第1領域において二つ以上のアミノ酸が置換されている、請求項9に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

## 【請求項11】

前記第1領域内の第342番アミノ酸及び第351番アミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されている、請求項9に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素

50

酵素。

【請求項 12】

配列番号 1 のアミノ酸配列の第 278 番アミノ酸～第 320 番アミノ酸からなる第 2 領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項 9～11 のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

【請求項 13】

前記第 2 領域内の第 295 番アミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項 12 に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

【請求項 14】

配列番号 1 のアミノ酸配列の第 162 番アミノ酸～第 197 番アミノ酸からなる第 3 領域 10 において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項 9～13 のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

【請求項 15】

配列番号 1 のアミノ酸配列の第 75 番アミノ酸、第 168 番アミノ酸、及び第 347 番アミノ酸からなるグループより選択される一以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、請求項 9～14 のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

【請求項 16】

グルコースに対する反応性を基準として、マルトースに対する反応性が 40% 以下、ガラクトースに対する反応性が 10% 以下である、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコ 20  
ース脱水素酵素。

【請求項 17】

請求項 1～16 のいずれかの改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 18】

請求項 17 に記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

【請求項 19】

請求項 17 に記載のポリヌクレオチドを保有する形質転換体。

【請求項 20】

請求項 19 に記載の形質転換体を、前記ポリヌクレオチドが発現可能な状態で培養する工 30  
程、及び

前記ポリヌクレオチドの発現産物を分離する工程、を含む改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の製造方法。

【請求項 21】

請求項 1～16 のいずれかの改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含んでなるグルコース測定用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明が属する技術分野】

本発明はピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素に関する。詳しくは、野生型 40  
の酵素と比較して特定の領域のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素に関する。本発明の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素は、例えば臨床検査などにおけるグルコース量の測定に利用される。

【0002】

【従来の技術】

ピロロキノリンキノン依存性  $\beta$ -D グルコース脱水素酵素 (EC 1. 1. 199, PQQ GDH) は補酵素ピロロキノリン (PQQ) と共役して  $\beta$ -D グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。この性質を利用して PQQ GDH は臨床検査や食品分析、培養プロセスのモニタリング等におけるグルコースの定量に利用されている。 50

過去に報告されたPQQGDHとしては、アシネトバクター・スピーシーズ (*Acinetobacter* sp.) L. M. D 79.41株が産生するPQQGDH及びその改変型PQQGDHが知られている(例えば、特許文献1~5、非特許文献1参照。)このL. M. D 79.41株が産生するPQQGDHの基質特異性は低く、例えばグルコースに対する反応性の約90%に相当する反応性をマルトースに対しても有するものであった。

【0003】

【特許文献1】

特開2000-312588号公報

【特許文献2】

特開2000-350588号公報

【特許文献3】

特開2001-197888号公報

【特許文献4】

特開2001-346587号公報

【特許文献5】

WO 02/34919 A1公報

【非特許文献1】

A-M Cleton-JansenらMol. Gen. Genet., 217, 430 (1989)

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

正確なグルコース量を測定するためにPQQGDHには高い基質特異性が要求される。例えば輸血による点滴を受けている患者を対象とした糖尿病の診断を行う場合などにおいて基質特異性の低いPQQGDHが用いられれば、測定値として得られるものはグルコース量のほかに輸液中のマルトース量を測り込んだものであり正確な血中グルコース量が求められない。同様に例えば肝機能障害のある患者を対象とした測定を行う場合においてはガラクトースの影響を受けて信頼性の高い測定が行えないおそれがある。このように基質特異性の低いPQQGDHではマルトースなどの他の糖質の影響を大きく受け、正確なグルコース量を測定できない。

【0005】

過去に報告された上記改変型PQQGDHでは野生型PQQGDHの一部のアミノ酸を置換することによって基質特異性の改善が行われている。しかしながら、依然としてマルトースやガラクトースに対する反応性がかかなり残存しており、より正確なグルコース量の測定を可能とすべく更なる基質特異性の向上が望まれている。特に、ガラクトースに対する反応性が十分に低いPQQGDHは未だ見出されておらず、その提供が切望されている。本発明は以上の背景の下、グルコースに対する基質特異性の高い改変型PQQGDHを提供することを目的とする。特に、マルトースに対する反応性の低さに加えてガラクトースに対する反応性が極めて低い改変型PQQGDHを提供することを目的とする。併せて、このような改変型PQQGDHの作製に利用することができるポリヌクレオチド、発現ベクター、及び形質転換体、更にはこれらを利用した改変型PQQGDHの作製方法、グルコース測定キットを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記目的を達成するためにアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) が産生するPQQGDHにおいて特定の領域のアミノ酸の置換と基質特異性の変化との関係を詳細に検討した。その結果、基質特異性に深く関与する複数の領域を見出すことに成功した。即ち、後述の実施例で示されるように本発明者らはアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) の野生型PQQGDHにおいて351番目のア

10

20

30

40

50

ミノ酸が置換されることによってマルトース及びガラクトースに対する反応性が顕著に低下することを見出した。また342番目のアミノ酸も同様に基質特異性に深く関与していることを見出した。ここで、これらのアミノ酸は第326番アミノ酸残基～第354番アミノ酸残基からなる二次構造内に位置することから、当該構造部分の改変によってグルコースに対する基質特異性を効果的に改善できると考えられた。

また、278番アミノ酸残基～320アミノ酸残基からなる二次構造内に位置する第295番アミノ酸残基も同様にマルトース及びガラクトースに対する反応性に大きく関与することが示され、このことから当該構造部分の改変もグルコースに対する基質特異性の改善に極めて有効であると考えられた。同様に、169番アミノ酸残基の置換によって基質特異性の向上が見られたことから、これが位置する162番アミノ酸残基～197番アミノ酸残基からなる2次構造部分の改変も基質特異性の改善に有効であると考えられた。

さらに、その他のいくつかのアミノ酸残基が基質特異性に関与することが示唆された。ここで、同一の機能を有するタンパク質は一般にその活性部位や基質特異性に関与する領域の構造が類似していることが多い。従って、アシネトバクター・カルコアセチカス由来のPQQGDHにおける特定のアミノ酸の置換と基質特異性の関係に関して得られた上記情報は他の微生物由来のPQQGDHについても適用できると予想された。

本発明は以上の知見に基づき完成されたものであって、以下の構成を提供する。

[1] 対応する野生型酵素のアミノ酸配列を基準として、アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第326番アミノ酸～第354番アミノ酸からなる第1領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が置換されてなるアミノ酸配列を有する、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[2] 前記第1領域に相当する領域において二つ以上のアミノ酸が置換されている、[1]に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[3] 前記第1領域内の第342番アミノ酸及び第351番アミノ酸に相当するアミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されている、[1]に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[4] アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第278番アミノ酸～第320番アミノ酸からなる第2領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[1]～[3]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[5] 前記第2領域内の第295番アミノ酸に相当するアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[4]に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[6] アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第162番アミノ酸～第197番アミノ酸からなる第3領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[1]～[5]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[7] アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素における第75番アミノ酸、第168番アミノ酸、及び第347番アミノ酸にそれぞれ相当するアミノ酸からなるグループより選択される一以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[1]～[6]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[8] アシネトバクター・カルコアセチカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来である、[1]～[7]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[9] 配列番号1のアミノ酸配列において、第326番アミノ酸～第354番アミノ酸からなる第1領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されてなるアミノ酸

配列を有する、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[10] 前記第1領域において二つ以上のアミノ酸が置換されている、[9]に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[11] 前記第1領域内の第342番アミノ酸及び第351番アミノ酸がそれぞれ他のアミノ酸に置換されている、[9]に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[12] 配列番号1のアミノ酸配列の第278番アミノ酸～第320番アミノ酸からなる第2領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[9]～[11]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[13] 前記第2領域内の第295番アミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[12]に記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[14] 配列番号1のアミノ酸配列の第162番アミノ酸～第197番アミノ酸からなる第3領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[9]～[13]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[15] 配列番号1のアミノ酸配列の第75番アミノ酸、第168番アミノ酸、及び第347番アミノ酸からなるグループより選択される一以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている、[9]～[14]のいずれかに記載の改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[16] グルコースに対する反応性を基準として、マルトースに対する反応性が40%以下、ガラクトースに対する反応性が10%以下である、改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素。

[17] [1]～[16]のいずれかの改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

[18] [17]に記載のポリヌクレオチドを含有するベクター。

[19] [17]に記載のポリヌクレオチドを保有する形質転換体。

[20] [19]に記載の形質転換体を、前記ポリヌクレオチドが発現可能な状態で培養する工程、及び

前記ポリヌクレオチドの発現産物を分離する工程、を含む改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素の製造方法。

[21] [1]～[16]のいずれかの改変型ピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素を含んでなるグルコース測定用キット。

[0007]

【発明の実施の形態】

本発明では、対応する野生型酵素と比較して特定の領域のアミノ酸配列が置換されている改変型のPQQGDHが提供される。本発明の改変型PQQGDHは典型的には、天然に存在するPQQGDH、即ち野生型のPQQGDHにおいて一部のアミノ酸を他のアミノ酸に置換することによって作製或いは設計される。このように本発明の改変型PQQGDHの基礎となる（由来する）野生型のPQQGDHのことを本明細書では「対応する野生型の酵素」と表現する。本発明における野生型酵素としては、アシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・プテダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセンス (*Pseudomonas fluorescens*)、バークホルデリア・セパシア (*Burkholderia cepacia*)、グルコンバクター・オキシダンス (*Gluconobacter oxydans*)、アセトバクター・アセチ (*Acetobacter acetii*) 等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオバクター (*Agrobacterium radiobacter*)、エシェリヒア・コリ、クレブシエラ・エーロジエンス (*Klebsiella aerogenes*) 等が産生するPQQGDHを例示することができる。

[0008]

本明細書においてアミノ酸残基または領域について使用する場合における「相当する」とは、比較されるタンパク質（酵素）間において、構造に起因する機能が同等であることを意味し、特にマルトースやガラクトースなど、グルコース以外の糖質に対する反応性についての機能が同等であることを意味する。例えばアシネトバクター・カルコアセティカス以外の微生物に由来するPQQGDHにおいて、一次構造を比較し、且つ二次構造の相同性を考慮した上でアシネトバクター・カルコアセティカス由来のPQQGDHのある二次構造領域と同じ機能を有していると合理的に考えられる領域は「アシネトバクター・カルコアセティカス由来のPQQGDHの当該二次構造領域に相当する」と言うことができる。

本明細書においてアミノ酸の位置はN末端のアスパラギン酸を1としてN末端側からC末端側に向かって順番に番号付けを行った場合の番号によって特定される。 10

#### 【0009】

本発明の改変型PQQGDHでは対応する野生型酵素のアミノ酸配列を基準として、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素（以下、「A. C. PQQGDH」という）における第326番アミノ酸～第354番アミノ酸からなる第1領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されている。本明細書におけるA. C. PQQGDHのアミノ酸配列は配列番号1によって特定される配列である。この配列は後述の実施例で示されるようにアシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552株が産生するPQQGDHのアミノ酸配列である。 20

#### 【0010】

以上のアミノ酸の置換に加えて、A. C. PQQGDHにおける第278番アミノ酸～第320番アミノ酸からなる第2領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが好ましい。

更には、A. C. PQQGDHにおける第162番アミノ酸～第197番アミノ酸からなる第3領域に相当する領域において一つ以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが好ましい。

加えて、A. C. PQQGDHにおける第75番アミノ酸、第168番アミノ酸、及び第347番アミノ酸にそれぞれ相当するアミノ酸からなるグループより選択される一以上のアミノ酸が他のアミノ酸に置換されていることが好ましい。 30

#### 【0011】

各領域において置換されるアミノ酸の数は特に限定されない。但し、上記第1領域に相当する領域では二つ以上のアミノ酸が置換されていることが好ましい。

また、各領域において置換されているアミノ酸の位置は特に限定されないが、例えば上記の第1領域に相当する領域においては当該第1領域内の第342番アミノ酸及び／又は第351番アミノ酸に相当する位置のアミノ酸が置換されていることが好ましい。同様に、第2領域に相当する領域においては当該第2領域内の第295番アミノ酸に相当する位置のアミノ酸が置換されていることが好ましく、第3領域に相当する領域においては当該第3領域内の第169番アミノ酸に相当する位置のアミノ酸が置換されていることが好ましい。 40

#### 【0012】

ここで、置換後のアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば第75番アミノ酸位置ではトリプトファン、第168番アミノ酸位置ではヒスチジン、第169番アミノ酸位置ではフェニルアラニン、第295番アミノ酸位置ではグルタミン酸やアスパラギン酸、チロシン、フェニルアラニンなど、第342番アミノ酸位置ではプロリン、第347番アミノ酸位置ではアルギニン、第351番アミノ酸位置ではスレオニンである。

#### 【0013】

本発明の改変型PQQGDHは、野生型の酵素に比してグルコースに対する選択性が向上していることを特徴とする。即ち本発明の改変型PQQGDHは野生型の酵素に比較してマルトースやラクトースなどに対する反応性が低く、特にガラクトースに対する反応性が 50



顕著に低いという特徴を有する。グルコースに対する反応性を100%とした相対値で表せば、本発明の改変型PQQGDHはマルトースに対する反応性が好ましくは40%以下であり、より好ましくは30%以下であり、さらに好ましくは20%以下である。同様にラクトースに対する反応については好ましくは50%以下であり、より好ましくは40%以下である。ガラクトースに対する反応性については好ましくは20%以下であり、より好ましくは10%以下であり、さらに好ましくは実質的に0%である。尚、本明細書において単に「基質特異性」という場合には、このグルコースに対する選択性を意味する。

#### 【0014】

本発明の改変型PQQGDHでは上記のアミノ酸置換に加えて、さらに一部のアミノ酸の改変が行われていてもよい。ここでの「一部のアミノ酸の改変」とは、アミノ酸配列を構成する1〜数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1〜数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変化が生ずることをいうが、このような改変は原則としてPQQGDHとしての活性（即ちグルコースに対する反応性）が維持される限りにおいて行うことができる。但し、PQQGDH活性が多少低下する場合であっても、他の基質（例えばマルトースやガラクトース）に対する反応性も低下して却ってグルコースに対する基質特異性が向上する場合や、基質特異性が多少低下したとしてもグルコース量の測定に利用するのに支障のない場合などであれば上記のごとき改変が許容される。以上のような一部のアミノ酸の改変は、マルトースやガラクトースなどに対する反応性が低い状態に維持される範囲内で行われることが好ましい。

ここでの改変に供されるアミノ酸の位置は特に限定されず、また複数の位置で改変が行われてもよい。ここでの複数とは例えば全アミノ酸の10%以内に相当する数であり、好ましくは全アミノ酸の5%以内に相当する数である。さらに好ましくは全アミノ酸の1パーセント以内に相当する数である。

#### 【0015】

本発明の改変型PQQGDHは、まず野生型のPQQGDHをコードする遺伝子を取得し、次いでそれを改変して改変型PQQGDHをコードするポリヌクレオチドを構築し、最後に当該ポリヌクレオチドを適当な発現系において発現させることによって作製され得る。以下に当該作製方法について説明する。尚、一旦その配列が設計された後は配列情報に基づきデオキシヌクレオチド三リン酸（dATP、dTTP、dGTP、dCTP）を材料とした化学合成によって本発明の改変型PQQGDHをコードするポリヌクレオチド（遺伝子）を調製することができる。

#### 【0016】

<野生型PQQGDHをコードする遺伝子の取得>

まず、PQQGDH生産菌からPQQGDHをコードする遺伝子を取得する。PQQGDH生産菌としては、例えばアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ（*Acinetobacter baumannii*）、シュードモナス・エルギノサ（*Pseudomonas aeruginosa*）、シュードモナス・プチダ（*Pseudomonas putida*）、シュードモナス・フルオレッセンス（*Pseudomonas fluorescens*）、バークホルデリア・セバシア（*Burkholderia cepacia*）グルコノバクター・オキシダンス（*Gluconobacter oxydans*）、アセトバクター・アセチ（*Acetobacter acetii*）等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオブクター（*Agrobacterium radiobacter*）、エシェリヒア・コリ、クレブシエラ・エーロジーンズ（*Klebsiella aerogenes*）等の腸内細菌を挙げることができる。中でもアシネトバクター・カルコアセティカスをPQQGDH生産菌として用いることが好ましい。

#### 【0017】

PQQGDHをコードする遺伝子はPQQGDH生産菌の菌体から常法によって抽出することができる。PQQGDHのゲノムDNAを鋳型としたPCR法等を利用してPQQGDH遺伝子を調製することもできる。一方、抽出した遺伝子をPCR法等の増幅方法を利

用して一旦増幅し、そして増幅産物を以降の操作に供してもよい。尚、PQQGDHをコードする遺伝子の塩基配列が同定された後は、化学的手法によっても目的とするPQQGDH遺伝子を調製することができる。以下、PQQGDH遺伝子を調製する方法の一例としてアシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552株を出発材料とした場合について具体的に説明する。

#### 【0018】

まず、アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552の染色体を分離、精製した後、超音波処理や制限酵素処理等を実施して得られるDNA断片と、リニアな状態に調製した発現ベクターとをDNAリガーゼなどを利用して両者の平滑末端又は付着末端において結合閉鎖させ、組換えベクターを構築する。公知のアシネトバクター・スピーシーズL, M, D 79, 41株由来のPQQGDH遺伝子の塩基配列を基に設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によってPQQGDH遺伝子を増幅し、DNAリガーゼにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築することもできる。次に、以上のいずれかの方法により構築した組換えベクターをそれが自律複製可能な宿主微生物に移入する。そして、発現ベクターに固有のマーカーとPQQGDH酵素活性を指標としてスクリーニングし、PQQGDHをコードする遺伝子を含む組換えベクターで形質転換された宿主微生物を得る。

#### 【0019】

次いで、必要に応じて選抜された形質転換体を培養した後、菌体を回収する。回収した菌体から常法に従って組換えベクターを分離、精製する。このようにして目的のPQQGDH遺伝子を含む組換えベクターが取得される。かかる組換えベクターからのPQQGDH遺伝子の分離は制限酵素処理等によって行うことができる。

#### 【0020】

ここで、アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552からのPQQGDH遺伝子の取得方法の一例についてその詳細を以下に示す。まず、アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552を例えば1~3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心処理して集菌し、次いで菌体を溶菌させることによりPQQGDH遺伝子を含む溶菌物を調製する。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理を行うことができる。また、必要に応じてプロテアーゼ等の酵素処理やラウリル硫酸ナトリウム(SDS)等の界面活性剤による処理を併用してもよい。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

#### 【0021】

上記のようにして得られた溶菌物からのDNAの分離、精製は常法に従って行うことができる。例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

#### 【0022】

微生物から分離、精製されたDNAからPQQGDH遺伝子を取得するために、既に明らかにされているアシネトバクター・スピーシーズL, M, D 79, 41株の塩基配列を基にしたプライマーを用いた遺伝子増幅反応を行う。

#### 【0023】

増幅されたPQQGDH遺伝子を適当なベクターにクローニングすることも可能である。クローニングの際のベクター(クローニングベクター)としては、宿主微生物内で自律的に複製し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。このようなファージの例としては大腸菌(*Escherichia coli*)を宿主微生物とするLambda gt10、Lambda gt11などが挙げられる。同様にプラスミドの例としては大腸菌(*Escherichia coli*)を宿主微生物とするpBR322、pUC19、pBluescript、pTrc99、pGEM-T vectorなどが挙げられる。

#### 【0024】

ベクターへのクローニングは、上述の方法で取得したPQQGDH遺伝子をベクターのク

ローニングサイトに挿入することにより行われる。かかる操作は制限酵素及びDNAリガーゼを利用した周知の方法によって行うことができる。

【0025】

クローニングに使用する宿主微生物としては、その中で組換えバクテリヤが安定かつ自律増殖可能であって、さらに外来性遺伝子を形質発現できるものであれば特に限定されない。一般的には大腸菌 (*Escherichia coli*) W3110、大腸菌 C600、大腸菌 HB101、大腸菌 JM109、大腸菌 DH5 $\alpha$  などを用いることができる。

【0026】

宿主微生物に組換えバクテリヤを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合を例に採れば、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

目的の組換えバクテリヤが適切に導入された宿主微生物を選択するには、バクテリヤが有するマーカー（例えば薬剤耐性遺伝子）の発現と、PQQの添加によるGDH活性の発現が同時に認められる微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつPQQGDHを産生する微生物を選択すればよい。このような方法によって選択された形質転換体は、栄養培地で培養されることにより、多量のPQQGDHを安定に生産し得る。

【0027】

以上の方法により得られた野生型PQQGDH遺伝子の塩基配列を *Science*、第214巻、1205（1981）に記載されたジデオキシ法により解読した（図1、配列番号2）。また、PQQGDHのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した（図1、配列番号1）。尚、シグナル領域を含む、遺伝子配列（配列番号4）及びアミノ酸配列（配列番号3）は図2に示される。

【0028】

PQQGDH遺伝子を保有する組換えバクテリヤから回収したPQQGDH遺伝子を遺伝子工学的手法を用いて容易に改変することができる。具体的には例えば部位特異的変異法を用いて、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように遺伝子の改変を行う。

【0029】

<改変型PQQGDHをコードするポリヌクレオチドの構築>

以上のようにして取得されたPQQGDH遺伝子に対して、発現産物であるタンパク質において特定のアミノ酸が置換されるように変異を加えることにより、目的とする改変型PQQGDHをコードする遺伝子を作製することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための方法は当該技術分野において数多く知られており（例えば、*Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York*を参照）、その中から適切な方法を選択して用いることができる。尚、PQQGDH遺伝子にランダムな変異を挿入し、各変異体（改変体）の発現産物の基質特異性を比較して好ましい基質特異性を有する遺伝子を選択することによっても、改変型PQQGDHをコードする遺伝子を作製することができる。このようなランダム変異を導入する場合は、まず例えばエラープライムPCRを利用して標的とする遺伝子領域にランダムに変異を導入し、改変型PQQGDH遺伝子ライブラリーを構築する。ランダム変異によって得られた有用な変異の組合せを有する多重置換体はノバルティスファーマ社によりバイオサイエンスとインダストリー誌 vol. 59, No. 3（2001）、P35-38に報告されているミューテーションスクランプリング法にて得ることが出来る。この方法では、得られたコロニーの培養、リゾチームなど溶菌酵素を用いた菌体の溶菌、そして酵素活性の測定といった手順により、簡便かつ容易に改変型酵素の評価が行える。

【0030】

改変型PQQGDH遺伝子ライブラリーを効率良くスクリーニングするため、予めPQQ

G D H遺伝子にヒスチジンタグをコードする塩基配列を付加しておくことができる。このようにすることによって、生育状態、発現効率などに起因して産生酵素量変動するとしても、一定量を用いた酵素活性の評価などを行うことができる。具体的には、例えばマイクロプレートのようなタンパク質吸着性の基材表面に一定量の抗ヒスチジンタグモノクローナル抗体を吸着させ、非特異的なタンパク質の吸着防止処理を施した後、上記溶菌液と反応させることで、上記溶菌液に含まれる内の一定量のP Q Q G D Hを基材上に固相化し酵素活性を評価することができる。上記操作を96穴マイクロプレートで行うことにより一度に多数の改変体の単位量あたりの酵素活性を効率良く評価することが出来る。

目的とする改変型遺伝子を保有するクローンの選択は例えば次のように行われる。溶菌液に1-methoxy-PMSとXTTを加えて一定時間経過した後の410nmの吸光度をもとにP Q Q G D Hの活性を測定し、そしてマルトースに対する反応性が野生型P Q Q G D Hに比べ約80%以下に低下している検体をまず選択し、次にグルコースに対する反応性が野生型P Q Q G D Hに比べ約90%以上保持されているクローンを選択する。ここで得られたクローンの塩基配列を解析してその変異を確認する。

#### 【0031】

##### <改変型P Q Q G D H遺伝子の発現>

改変型P Q Q G D H遺伝子の発現には、大腸菌を宿主とする発現系などを利用することができる。例えば、まず上述の方法によって調製された改変型P Q Q G D H遺伝子が大腸菌を宿主とするベクター（例えばpUCベクター、pBluescriptベクター）に挿入して発現ベクターを構築する。当該発現ベクターには宿主内での改変型P Q Q G D Hの発現に必要なプロモーター配列、複製開始点、ターミネータ配列などが含まれる。

#### 【0032】

宿主微生物に発現ベクターを導入（移入）する方法としては、例えば宿主微生物が大腸菌（*Escherichia coli*）の場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。宿主微生物への発現ベクターが適切に導入された宿主微生物の選択は、発現ベクターが有する薬剤耐性マーカーの有無、及びP Q Qを添加した際のG D H活性の発現の有無を指標に行うことができる。例えば、発現ベクターの導入操作後の微生物を薬剤耐性マーカーを保有している場合のみに生育が可能な選択培地で培養し、続いて生育が認められた形質転換体の中から改変型P Q Q G D Hを産生するものを選択すればよい。

#### 【0033】

以上の操作によって選択された形質転換体を、それが良好に生育・増殖し且つ発現ベクターに挿入された改変型P Q Q G D H遺伝子が発現可能な条件で培養することにより、多量の改変型P Q Q G D Hを安定的に産生させることができる。

#### 【0034】

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えばグルコース、シュクロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えばペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

#### 【0035】

形質転換体が生育可能であって且つ改変型P Q Q G D Hが産生される温度条件で形質転換体の培養が行われる。例えば、20℃～30℃の範囲内に培養温度を設定することができる。培養時間は、培養対象の形質転換体の生育特性や改変型P Q Q G D H産生特性、或いは必要とする改変型P Q Q G D H生産量などを考慮して設定することができ、例えば改変型P Q Q G D Hの収量が最大に達する時期に培養を完了させる。培養時間の目安としては12～72時間程度である。培地のpHは、形質転換体が生育し且つP Q Q G D Hが産生される範囲内に調整される。好ましくは培地のpHを6.0～9.0程度とする。

## 【0036】

改変型PQQGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま、或いは濃縮、不純物の除去などを経た後に酵素溶液として利用することもできるが、一般的には培養液又は菌体より改変型PQQGDHを一旦回収する。産生される改変型PQQGDHが分泌型タンパク質であれば培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、減圧濃縮、膜濃縮、硫酸アンモニウムや硫酸ナトリウムを利用した塩析、メタノールやエタノール又はアセトンなどによる分別沈殿法、透析、加熱処理、等電点処理、ゲルろ過や吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー等の各種クロマトグラフィー（例えば、セファデックス（Sephadex）ゲル（ファルマシアバイオテク）などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B（ファルマシアバイオテク）、オクチルセファロースCL-6B（ファルマシアバイオテク）、CMセファロースCL-6B（ファルマシアバイオテク））などを組み合わせて分離、精製を行うことにより改変型PQQGDHの精製品を取得することができる。他方、菌体内から回収する場合には、培養液をろ過、遠心処理等することによって菌体を採取し、次いで菌体を加圧処理、超音波処理などの機械的方法またはリゾチームなどによる酵素的で破壊した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより改変型PQQGDHの精製品を取得することができる。尚、必要に応じてEDTA等のキレート剤及び界面活性剤を添加してPQQGDHを可溶化し、水溶液として分離採取することができる。精製酵素は、電気泳動（SDS-PAGE）において単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

## 【0037】

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥や真空乾燥或いはスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素を予めリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解させておいてもよい。ここで使用される緩衝液として好適なものはGOODの緩衝液であり、中でもPIPES、MES又はMOPS緩衝液が特に好ましい。

## 【0038】

本発明の改変型PQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化して $\delta$ -グルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。かかる酵素活性は、PQQGDHによるグルコースの酸化に伴って還元されるPQQの量を酸化還元試薬の呈色反応により定量することが出来る。呈色試薬としては例えば、PMS-DCIP、1-methoxy-PMS-XTT、フェリシアン化カリウムなどを用いることが出来る。本発明においてはPQQGDH活性の測定を、原則として、以下の試薬を用い、以下の条件において行うこととする。

## &lt;試薬&gt;

10mM MOPS (pH 7.0)  
1mM 1-methoxy PMS (フェナジンメトサルフェート)  
0.25mM XTT  
5mM グルコース

## &lt;測定条件&gt;

上記試薬混液140 $\mu$ lを25℃で約5分子倍加温した後に0.1mlの酵素溶液を加え、緩やかに混和する。その後、水を対照とし、25℃に制御された分光光度計で15分間記録し、その直線部分から1分間あたりの410nmの吸光度変化を測定する。盲検は酵素溶液の代わりに蒸留水を試薬混液に加えて、以下同様に吸光度変化を測定する。上記条件で1分間に生成するホルマゼン1/2 $\mu$ molの酵素量を1単位(U)とする。

## 【0039】

本発明の改変型PQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質としてラクトース、マルトース、ガラクトース、シュクロース及びキシロース等の各種の糖を用いて上述と同様に酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べるこ

とにより評価することが出来る。

#### 【0040】

本発明の改変型PQQGDHを用いて、グルコース測定用キットを構築することができる。即ち、本発明の他の局面は改変型PQQGDHを含有するグルコース測定用キットを提供する。かかるキットには改変型PQQGDHの他に、測定する際に必要とされる緩衝液などの溶液や標準としてのグルコース溶液等を含有させることができる。

#### 【0041】

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

#### 【実施例1】 染色体DNAの分離

アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552株の染色体DNAを次の方法で分離した。同菌株を10mLのLB培地で30℃、一晚振とう培養した後、遠心処理（15000rpm、10分間）により集菌した。得られた菌体からDneasy tissue kit（キアゲン社）を用いて染色体DNAを抽出、精製し、そしてTEバッファに溶解した。

#### 【0042】

【実施例2】 PQQGDHをコードする遺伝子を含有するDNA断片の調製、及び当該DNA断片を含有する組換えバクテリアの構築

実施例1で得られた染色体DNAを鋳型とし、次のプライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によって、目的とするPQQGDH遺伝子を含むDNA領域を増幅させた。尚、ここで使用されるプライマーは、アシネトバクター・スピーシーズ L. M. D 79. 41株由来の可溶性PQQGDHの塩基配列（A-M Cleton-JansenらMol. Gen. Genet., 217, 430（1989））を基に設計した。

フォワードプライマー：5'-ACAAATCATATAGAGAACTCG-3'（配列番号5）

リバースプライマー：5'-T TACTTAGCCTTATAGGTGAACTTAATGAGAGATCCTGGG-3'（配列番号6）

PCRは以下の表1に示す組成の溶液中で行い、94℃2分間の反応、次に94℃30秒間、48℃30秒間、及び72℃2分間の反応を30サイクル、最後に72℃10分間の反応を行う条件とした。

#### 【0043】

##### 【表1】

TAKARA LA-taq	0.5	μL
10-fold buffer	5	μL
25mM MgCl <sub>2</sub>	5	μL
dNTP mix (2.5mM)	8	μL
フォワードプライマー (10pmol/μL)	1	μL
リバースプライマー (10pmol/μL)	1	μL
template		
H <sub>2</sub> Oで50	μL	に調整

#### 【0044】

得られた増幅遺伝子断片をpGEM-T Easy vector（キアゲン社）に連結し、このプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。尚、得られたプラスミドをpTGEM-GDHBとした。

#### 【0045】

【実施例3】 アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552の可溶性PQQGDHの塩基配列の決定

実施例2で得られたプラスミドpTGEM-GDHBに挿入された遺伝子断片の塩基配列をBigDye Terminator Sequencing Kit（アプライド・

10

20

30

40

50

バイオシステムズ社製)を用いて決定した。決定した塩基配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号2及び配列番号1に示す通りである。尚、シグナル領域を含めた塩基配列及びアミノ酸配列はそれぞれ配列番号4及び配列番号3に示される。アミノ酸配列から計算されたタンパク質の分子量は約50,000であり、アシネトバクター・カルコアセティカスの可溶性PQQGDHの分子量とはほぼ一致した。

【0046】

【実施例4】 PQQGDH遺伝子を含有する発現ベクターの構築

実施例2で得られたプラスミドpTGEM-GHDBを鋳型とし、次のプライマーを用いたPCRを行った。

フォワードプライマー: 5' - GCGGCCCGCGAATTCATGAATAAACAT TTAATTGGCTAAAATTACTTTAT-3' (配列番号7)

リバープライマー: 5' - GCGGCCCGCCTGCAGCTATTACTTAGCC TTATAGGTGAACCTTAATGAGAGATCCTGGG-3' (配列番号8)

PCRは以下の表2に示す組成の溶液中で行い、94℃2分間の反応、次に94℃30秒間、55℃30秒間、及び72℃2分間の反応を30サイクル、最後に72℃10分間の反応を行う条件とした。

【0047】

【表2】

Sigma KlenTaq	0.5	μL	
10-fold buffer	5	μL	
dNTP mix (10mM)	2.5	μL	
フォワードプライマー	(10 pmol/μL)	2	μL
リバープライマー	(10 pmol/μL)	2	μL
template			
H <sub>2</sub> O	50	μL	に調整

【0048】

得られた増幅遺伝子を制限酵素EcoRIとPstIにて切断した。切断した遺伝子断片を発現ベクターに連結し、このプラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。尚、得られた発現プラスミドをpUK-GDHB(S)とした(図3)。形質転換体を30℃、100 μg/mLアンピシリンと6 μM PQQを含む100 mLのLB培地で一晚培養したところPQQGDHの産生が認められた。尚、このPQQGDHの分子量をアミノ酸配列から計算したところ約50,000であり、アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552の分子量とはほぼ一致した。

【0049】

【実施例5】 アシネトバクター・カルコアセティカスPQQGDH遺伝子産物の製造  
LB培地1 Lを500 mL容フラスコに50 mLずつ分注し、121℃、20 minオートクレーブを行った。放冷後、別途無菌濾過した100 mg/mLアンピシリン溶液とイソプロピルガラクトピラノシド50 μLを添加し、PQQGDH発現ベクターpUK-GDHB(S)を有するコロニーを接種した。そして30℃で16時間振とう培養した。培養終了時のPQQGDH活性は約1 U/mLであった。

【0050】

培養終了後の培養液を遠心処理することにより回収した菌体を10 mM Tris-HCl (pH 7.5)に懸濁した。次に、菌体懸濁液を超音波破砕後、再度遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。この粗酵素液をカチオン凝集剤で処理し、脱塩濃縮した後、DEAEセファロース(ファルマシアバイオテック)、CMセファロース(ファルマシアバイオテック)カラムクロマトグラフィーにて分離、精製して精製酵素を得た。

【0051】

以上の方法によって得られたPQQGDHは電気泳動においてほぼ単一のバンドを示し、この際の比活性は約1600 U/mgであった。以下に、得られたPQQGDHの性質を

示す。

作用：D-グルコース + 人工電子受容体 → δ-グルコノラクトン + 還元型電

子受容体熱安定性：50℃ (pH 7.0、10分間処理)

pH安定性：pH6~9 (30℃、1時間処理)

至適温度：約50℃

至適pH：7.0

分子量：50,000

10

【0052】

【実施例6】 PQQGDHのC末端ヒスチジンタグの付加

まずPQQGDH遺伝子の下流にヒスチジンタグを導入し、続いてその直後に終始コドン  
を付加するプライマーを用いてPCRを行った。実施例4で得られたpUK-GDHB (S)  
を鋳型として、次のプライマーを用いたPCRを行った。

フォワードプライマー：5'-TCACATGTTCTTTCTCCTGCGTTATC-3'  
(配列番号9)

リバースプライマー：5'-ATGGTGATGGTGATGGTGCTTAGCCTT  
ATAGGTGAACCTTAATGAGA-3' (配列番号10、下線で示したのが6×  
ヒスチジンタグの配列)

20

PCRは実施例4と同様の組成及び条件にて行った。

続いて増幅遺伝子を鋳型としてヒスチジンタグの下流に翻訳終止コドンを導入するため次の  
プライマーを用いたPCRを行った。

フォワードプライマー：5'-TCACATGTTCTTTCTCCTGCGTTATC-3'  
(配列番号9)

リバースプライマー：5'-GCGGCCGCTGACGCTATTAAATGGTGA  
TGGTGCTTAGCCTTA-3' (配列番号11)

PCRは実施例4と同様の溶液組成及び条件にて行った。

【0053】

PQQGDH遺伝子下流にヒスチジンタグ、終止コドンが付加して得られた増幅遺伝子を  
EcoRIとPstIで切断した。切断した遺伝子断片を発現ベクターに連結し、このプ  
ラスミドで大腸菌JM109株を形質転換した。尚、得られた発現プラスミドをpUK-  
GDHB (S) C-Hisとした。形質転換体を30℃、100μg/mLアンピシリン  
と6μM PQQを含む100mLのLB培地で一晚培養したところPQQGDHの産生  
が認められた。尚、このPQQGDHの分子量をアミノ酸配列から計算したところ約50  
、000であり、アシネトバクター・カルコアセティカスIFO 12552の分子量と  
ほぼ一致した。さらに対照として実施例5で得られた野生型のPQQGDHと一般的性質  
を比較したところ同等であることが認められた。

30

【0054】

【実施例7】 変異PQQGDH遺伝子ライブラリーの構築

40

実施例6で得られたプラスミドpUK-GDHB (S) C-Hisを鋳型とし、次のプ  
ライマーを用いてエラーブローンPCR法を行い、変異の挿入を行った。

フォワードプライマー：5'-TCACATGTTCTTTCTCCTGCGTTATC-3'  
(配列番号9)

リバースプライマー：5'-GGCGCGTACTATGGTTGCTTTGA-3' (配  
列番号12)

変異導入の条件は以下の通りである。PCRは以下の表3に示す組成の溶液中で行い、9  
4℃5分間の反応、次に94℃1分間、50℃1分間、70℃2分間の反応を25サイク  
ル、最後に72℃7分間の反応を行う条件とした。

【0055】

50



## 【表3】

100mM Tris-HCl (pH8.3)	0.5 $\mu$ L
500mM KCl	5 $\mu$ L
1mg/mL BSA	2.5 $\mu$ L
(15~100mM) MgCl <sub>2</sub>	5 $\mu$ L
1mM MnCl <sub>2</sub>	1.25~3.75 $\mu$ L
10mM ATP	0.5~1.55 $\mu$ L
10mM TTP	0.5~5.0 $\mu$ L
10mM GTP	1.0~5.0 $\mu$ L
10mM CTP	0.5~5.0 $\mu$ L
フォワードプライマー (20 pmol/ $\mu$ L)	2.5 $\mu$ L
リバースプライマー (20 pmol/ $\mu$ L)	2.5 $\mu$ L
Dimethylsulfoxide	0~7.5 $\mu$ L
0.2 ng/ $\mu$ L template	5 $\mu$ L
rTaq Polymerase	0.5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> Oで50 $\mu$ Lに調整	

10

## 【0056】

変異の導入された遺伝子増幅断片をEcoRIとPstIで切断し、pUK-GDHB (S)の野生型遺伝子と入れ換えた。このようにして得られたプラスミドで大腸菌JM109を形質転換して変異遺伝子ライブラリーを構築した。

20

## 【0057】

得られたコロニーを96穴の培養用深溝マイクロプレート中の100  $\mu$ g/mLのアmpiシリン、5  $\mu$ MのPQQそして1mMの塩化カルシウムを含む600  $\mu$ LのCircle Grow Medium (ストラタジーン社)に接種し、37℃で一晩200 rpmの振とう条件で培養した。その後、菌体を遠心分離 (3000 rpm, 4℃, 30 min)で回収し、3倍に希釈された溶菌液 (50mM トリス緩衝液 pH8.0, 2mM EDTA, 1mg/mL リゾチーム, 15  $\mu$ M PQQ) 600  $\mu$ Lに再懸濁した。その後37℃で1時間振とうし、30  $\mu$ Lの20mM塩化カルシウム溶液を添加した。ライセートをフィルタープレート (コーニング社製)に移し、遠心分離した (2000 rpm, 4℃, 5 min)。得られた上清を以下のスクリーニングに用いた。

30

## 【0058】

スクリーニングに用いる96穴マイクロプレートには予め以下の方法で処理を施しておいた。即ち、まず96穴マイクロプレート (コースター社製)に15 ng/ $\mu$ LのProtein A/G液を100  $\mu$ L添加し37℃で約2時間定置した。次にPBS溶液で3回洗浄しブロッキング溶液を150  $\mu$ L添加し、37℃で約2時間定置し、スクリーニング用マイクロプレートとした。予め用意した80  $\mu$ Lの0.1 ng/ $\mu$ LのマウスIgG1抗5×ヒスチジンタグモノクローナル抗体の入った96穴マイクロプレートに上記の遠心上清を添加、混和し100  $\mu$ Lのブロッキング液をPBS溶液で洗浄除去したスクリーニング用マイクロプレートに添加し、25℃で1時間定置した。その後PBSで3回洗浄し140  $\mu$ LのPQQGDHアッセイ溶液 (4mM 1-methoxy PMS 3.5mL, 1mM XTT溶液 3.5mL, 20mM マルトースもしくはグルコース溶液 3.5mL, 40mM MOPS-NaOH pH7.0 3.5mLの混合液)を添加し、410 nmの吸光度を15分間室温で測定した。

40

## 【0059】

第一段階のスクリーニングはランダム塩基置換ライブラリーに対してマルトースを基質としたスクリーニングを実施し、酵素活性が野生型の約80%以下に低下した変異体を発現するクローンを同定した。同定された変異株に対して次にグルコースを基質としたスクリーニングを実施し、グルコースへの反応性に比しマルトースへの反応性の低下が大きい変異体を発現するクローンを得た。これら変異PQQGDH遺伝子の塩基配列を決定したところ75番目のグリシンがアルギニン、295番目のグリシンがグルタミン酸、342

50

番目のメチオニンがバリン、351番目のアラニンがスレオニン、168番目のグルタミンがヒスチジン、169番目のロイシンがグルタミン、347番目のトリプトファンがアルギニンに変異していることが明らかとなった。以下の表4に示されるように、本発明で得られた改変型PQQGDHはマルトースへの特異性が野生型に比し何れも低下していた。グルコースを基質としたときの野生型PQQGDHの活性を100とし、これに対する相対値としてマルトースに対する反応性を示した。尚、対照として実施例6で得られたヒスチジンタグを付加した野生型のPQQGDHを用いた。

表4のアミノ酸置換の欄における数字はアミノ酸番号を、数字の左側の記号は野生型におけるアミノ酸の種類を、数字の右側は変異後のアミノ酸の種類をそれぞれ表す。従って、例えばGly75Argは第75番アミノ酸のグリシンがアルギニンに置換された改変体を意味する。

【0060】

【表4】

野生型	100	97
Gly75Arg	100	72
Gln168Is	100	55
Leu169Gln	100	63
Gly295Glu	100	83
Met342Val	100	69
Trp347His	100	85
Ala351Thr	100	59

20

【0061】

【実施例8】 野生型PQQGDH遺伝子への部位特異的変異の導入と及び改変型PQQGDHの基質特異性の検討

30

QuikChange Site-directed Mutagenesis kit (ストラタジーン社)を用いて、配列番号4で示されるアシネトバクター・カルコアセティカス由来PQQGDHの構造遺伝子に部位特異的変異の導入を行った。実施例7で変異が導入された部位、即ち、75番目のグリシン、295番目のグリシン、342番目のメチオニン、351番目のアラニン、168番目のグルタミン、169番目のロイシン、347番目のトリプトファンの各部位のアミノ酸をコードする塩基配列がランダムに20種類のアミノ酸をコードするように置換される条件とした。各部位を20種類のアミノ酸に置換するプライマーの配列を表5に示す。尚、表5において各配列名の語尾に記したF及びRはそれぞれフォワード及びリバースを表す。

【0062】

40

【表5】

配列名：配列

GDHB/G100-F: 5' -GTAAATGATGCTGATNNNCAAACG  
GTTTATTGGG-3' (35mer、配列番号13)  
GDHB/G100-R: 5' -CCCAATAAACCGTTTGTGNNNATCAG  
CATCATTTTAC-3' (35mer、配列番号14)  
GDHB/G320-F: 5' -CAAATTAAGATTTANNNCAAATG  
GTTTAAAAGTGGC-3' (38mer、配列番号15)  
GDHB/G320-R: 5' -GCCACTTTTAAACCAATTTGTGNNNTA  
AATCTTTTAATTTG-3' (38mer、配列番号16)

50

GDHB/M367-F: 5' - CCAACCTgTgggATNNNACCTACA  
 TTTgCTgg-3' (33mer、配列番号17)  
 GDHB/M367-R: 5' - CCAgCAAATgTAaggTNNNATCCCCA  
 CAggTTgg-3' (33mer、配列番号18)  
 GDHB/A376-F: 5' - gCCAACggTTNNNCCgTCATCTgCT  
 TATgTCTA-3' (33mer、配列番号19)  
 GDHB/A376-R: 5' - TAgACATAAgCAgATgACggNNNAA  
 CCgTTggC-3' (33mer、配列番号20)  
 GDHB/Q193-F: 5' - GATCAGGGGGCGTAACNNNCTGGCTT  
 ATTTATTC-3' (33mer、配列番号21)  
 GDHB/Q193-R: 5' - GAATAAATAAGCCAGNNNGTTACGC  
 CCTTGATC-3' (33mer、配列番号22)  
 GDHB/L194-F: 5' - GGGGCGTAACCAGNNNGCTTATTTA  
 TTCTTACC-3' (33mer、配列番号23)  
 GDHB/L194-R: 5' - GGTAAGAATAAATAAGCNNNCTGGT  
 TACGCCCC-3' (33mer、配列番号24)  
 GDHB/W372-F: 5' - ggATATgACCTACATTTgCNNNCCA  
 ACggTTgCgCCg-3' (37mer、配列番号25)  
 GDHB/W372-R: 5' - CggCgCAACCgTTggNNNgCAAATg  
 TAggTCATATCC-3' (37mer、配列番号26)

10

20

【0063】

QuikChange Site-directed Mutagenesis kit  
 に付属する1 $\mu$ LのPfuTurbo DNAポリメラーゼ(2.5U/ $\mu$ L)、125  
 ngのフォワードとリバースの各プライマー、dNTPのミックス、10ngのpUK-  
 GDHB(S)と1/10量のPCRバッファーとを混合した。反応条件は95℃30秒  
 間、次に、95℃30秒間、55℃1分間、及び68℃10分間を16サイクルとした。  
 反応終了後に鋳型DNAを除去するためにキットに付属の制限酵素DpnI(10U/ $\mu$   
 L)を1 $\mu$ L添加し、37℃で1時間インキュベートした。反応産物の1 $\mu$ Lを用いて大  
 腸菌XL1-Blueを形質転換しコロニーを得た。

【0064】

次に、得られた形質転換体のコロニーを600 $\mu$ LのCircle Grow medi-  
 um(ストラクジーン社)に接種し、実施例7と同様の方法でスクリーニングを行った。  
 その結果選択された変異株の塩基配列を決定したところ、以下の表6に示されるようにア  
 ミノ酸置換が行われた各種の変異体が見られていることがわかった。一方、これらの各変  
 異体をアンピシリン100 $\mu$ g/mL、0.01mMのイソプロピルチオガラクトシド及  
 び6 $\mu$ MのPQQを含む2mLのLB培地で30℃、一晚培養した。培養後、菌体を遠心  
 分離で回収し、6 $\mu$ MのPQQを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)500 $\mu$   
 Lに再懸濁した。続いて懸濁溶液に250mgのガラスビーズ(安井器械社製)を加え、  
 マルチビーズショッカー(安井器械社製)(2000rpm、回転60秒間、インテ  
 ーバル30秒間を7サイクル)によって菌体を破碎した。

30

40

【0065】

菌体破碎後の溶液を遠心分離(15000rpm、10分間、4℃)し、上清をHi-  
 s MicroSpin Purification Module(アマシャム・ファ  
 ルマシアバイオテック社製)を用いて精製した。その結果、200 $\mu$ Lの精製酵素溶液が得  
 られた。この精製酵素溶液にPQQを5 $\mu$ Mとなるように添加し、そして1mM塩化カ  
 ルシウム存在下で1時間以上放置してホロ化を行った。

【0066】

以上のようにして得られた各改変型PQQGDHの基質特異性を次の方法で測定した。即  
 ち、精製酵素溶液を50 $\mu$ Lずつ分注した後、130 $\mu$ Lのアッセイ溶液(20mM M-  
 OPS pH7.0に溶解された3.3mM 1-methoxy PMSを60 $\mu$ L

50

20 mM, 171  $\mu$ M XTTを70  $\mu$ L) 及びD-グルコース溶液20  $\mu$ Lを最終濃度5 mMになるように添加し、実施例5に示した方法に従いPQQGDH活性を測定した。尚、対照として実施例6で得られたヒスチジナグを付加した野生型のPQQGDHを用いた。測定結果を表6に示す。表6から明らかなように、野生型のPQQGDHに比較していずれの改変型PQQGDHもマルトース及びガラクトースに対する反応性が低下しており、またラクトース及びガラクトースに対する反応性も同時に低下している改変体も得られた。尚、表6のアミノ酸置換の欄における数字はアミノ酸番号を、数字の左側の記号は野生型におけるアミノ酸の種類を、数字の右側は変異後のアミノ酸の種類をそれぞれ表す。従って、例えばGly75 Trpは第75番アミノ酸のグリシンがトリプトファンに置換された改変体を意味する。

10

【0067】

【表6】

アミノ酸置換	グルコース	マルトース	ラクトース	ガラクトース
野生型	100	90	75	34
Gly75Trp	100	78	88	42
Gln168Ser	100	35	64	16
Gln168Gly	100	24	63	12
Gln168Tyr	100	74	69	23
Leu199Phe	100	48	78	33
Gly295Cys	100	80	74	36
Gly295Asp	100	64	77	36
Gly295Glu	100	75	72	37
Gly295Phe	100	76	79	34
Gly295Val	100	63	125	37
Gly295Tyr	100	32	81	28
Met342Pro	100	78	61	39
Met347His	100	86	90	57
Ala351Thr	100	60	86	21

20

30

【0068】

【実施例9】 ミューテーションスクランブリング法を利用した多重変異の導入及び多重置換体の基質特異性の検討

40

実施例8で明らかにされた、基質特異性の向上に有効なアミノ酸置換の可能なすべての組み合わせを有する多重置換体ライブラリーをミューテーションスクランブリング法により作製することにより、各アミノ酸置換を単独で有する場合に比べてより高い基質特異性を有する改変体の取得を試みた。多重置換体ライブラリーの作製には既報のバイアスミューテーションスクランブリング法（第39回日本生物物理学会年会、平成13年10月6日開催、演題番号1P057、ノバルティスファーマ社；Biopolymer、64号（2002年）、P. 95-105）を利用した。バイアスミューテーションスクランブリング法はミューテーションスクランブリング法の改変法であり、組み合わせるアミノ酸置換の導入確率を自由に設定可能であるという特徴を有する。本実施例では、構造モデルからの推定によって基質結合部位の近傍に位置しており特に基質特異性への貢献度が高いと

50

期待されるG75, G295, M342, A351については80%の高確率で、構造的に特徴が認められると考えられるQ168, L169, W347については50%の確率で変異が導入されるような条件に設定した。具体的には、PQQGDH遺伝子全長を、末端が重複し且つ実施例8で明らかにされたアミノ酸置換を1~3個含むような図4に示した5つの断片に分割し、各アミノ酸置換が上記の確率で導入されるように図5に示した各断片の混合比率でミューテーションスクランブリング法を施行してPQQGDH遺伝子の再構築を行った。

【0069】

ミューテーションスクランブリング法では、まず野生型遺伝子を鋳型としたPCRを行い部分増幅産物を得た(図4)。PCRに使用した反応液の組成を表7に示す。プライマー 10にはG75を含みQ168とL169に対応する配列を含むものを用いた。

【0070】

【表7】

10×buffer for AccuTaq (シグマ社製) 2  $\mu$ L  
 10mM dNTP 1  $\mu$ L  
 フォワードプライマー (10 pmol/ $\mu$ L) 1.2  $\mu$ L  
 リバースプライマー (10 pmol/ $\mu$ L) 1.2  $\mu$ L  
 Template (10 ng/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L  
 dH<sub>2</sub>O 13.9  $\mu$ L  
 AccuTaq (5 units/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L  
 Totalで20  $\mu$ L

20

【0071】

フォワードプライマー: 5'-TCACATGTTCTTTCTGCGTTATC-3'  
 (配列番号9)

S-primer (G)-10-QL: 5'-AAG AATAAATAAGCCAGTTGgTTACgCCCCCTgATC-3' (配列番号27)

反応条件は98℃30秒間、次に94℃5秒間、60℃20秒間、及び68℃90秒間を30サイクル、最後に68℃10分間とした。次に同じ反応条件でG75に変異を有する改変型遺伝子を鋳型としてPCRを行い、上記と同じ領域の部分増副産物を得た。ここで、表6からわかるようにG75部位、Q168部位、L169部位のアミノ酸置換の組み合わせは16通り存在する。これらすべての組み合わせに対応する部分増副産物は、図4に示した8種類のプライマー(S-primer (G)-10-QL~S-primer (G)-10-YF)を用い、野生型と改変型の2種の遺伝子を鋳型にした遺伝子増幅反応を行うことによって調製された。得られた部分増幅産物を図5の混合比で混合して断片1(断片1、図4を参照)を得た。断片2から断片5(断片2、断片3、断片4、断片5、図4を参照)は、断片1の場合と同様の要領で、図4に示したプライマーを利用して得られる遺伝子増幅産物を図5にそれぞれ示される比率で混合することにより調製された。

30

【0072】

次に上述の各断片を等量ずつ混合し、以下の表8に示す溶液組成においてPCRを行った。反応条件は98℃30秒間、次に94℃5秒間、60℃20秒間、及び68℃2分間を50 5サイクルとした。PCR反応終了後、2.4  $\mu$ Lずつの上記プライマー(10 pmol/ $\mu$ L)(配列番号7及び8)を添加し、再度PCRを行った。このときの反応条件は94℃5秒間、次に60℃20秒間、及び68℃2分間を25サイクル、最後に72℃10分間とした。

【0073】

【表8】

混合された断片 X  $\mu$ L  
 10×buffer for AccuTaq (シグマ社製) 2  $\mu$ L  
 10mM dNTP 1  $\mu$ L  
 dH<sub>2</sub>O (14.4-X)  $\mu$ L

50

AccuTaq (5 units/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L

Totalで17.6  $\mu$ L

【0074】

以上の操作によって得られた改変型遺伝子のライブラリーをEcoRIとPstIで切断し、pUK-GDHB(S)の野生型遺伝子と入れ替え、大腸菌を形質転換した。形質転換体のコロニーを実施例8に示した方法で培養した後、PQQGDH活性及び基質特異性を指標としてスクリーニングを行った。基質特異性の向上が見られたクローンについてはそれが保有する改変型PQQGDHの塩基配列を決定した。その結果、図6の表に示すように、置換されるアミノ酸の組合わせが異なる複数の改変型PQQGDHが得られたことが判明した。尚、図6の表においてG75(GGA)等の記号は、数字で特定されるアミノ酸位置が数字の左側のアルファベット一文字で特定されるアミノ酸であることを意味する。またカッコ内は当該アミノ酸をコードする塩基配列を表す。一方、Phe(TTT)等はそれが位置する列の最上段に記載された記号(例えばL194(CTG))で特定されるアミノ酸位置が当該アルファベット3文字で特定されるアミノ酸に置換されていることを意味する。またカッコ内は当該アミノ酸をコードする塩基配列を表す。

【0075】

これらの改変型PQQGDHを保有する各形質転換体を実施例7に示した方法と同様の方法で精製した後、各基質に対する反応性を測定した。測定結果を図6の表の右欄に示した。この表から明らかなように、取得された改変型PQQGDHは野生型に比較していずれもマルトースに対する反応性が顕著に低下している。また、ラクトースに対する反応性についても同様の低下が認められる。さらにガラクトースに対する反応性についてはいずれの改変型PQQGDHにおいても大きく低下し、一部のものではその反応性の低下は著しい。このように、マルトース、ラクトース、及びガラクトースに対する反応性が顕著に低下した、即ち基質特異性に極めて優れた改変型PQQGDHを取得することができた。この結果から図6の表に示されるアミノ酸位置の変異を組み合わせることにより、単独の変異の場合に比較して更に基質特異性に優れた改変型PQQGDHを作製することができることが分った。

【0076】

ここで、特にNo. 1改変体ではマルトースに対する反応性が野生型に比べて1/9にまで低下しており、同様にラクトースに対する反応性では約1/2、ガラクトースに対する反応性では約1/9にまでそれぞれ低下している。また、No. 6改変体においてもマルトースに対する反応性が野生型に比べて1/2以下に低下していると同時に、ラクトースに対する反応性も低下し、ガラクトースに対する反応性についても約1/4に低下している。同様に、No. 7改変体においてもマルトースに対する反応性が野生型に比べて約1/5にまで低下していると同時に、ラクトースに対する反応性も約1/2にまで低下し、ガラクトースに対しては実質的に反応性がないことがわかる。以上のように基質特異性の向上が特に顕著であったNo. 1、No. 6及びNo. 7改変体におけるアミノ酸置換部位を比較すれば、第342番アミノ酸及び第351番アミノ酸の置換が基質特異性の向上に特に重要であることが示唆される。次いで、第295番アミノ酸の置換が重要であり、また第194番アミノ酸の置換も基質特異性の向上に大きく関与することが予想される。

【0077】

本発明は、上記発明の実施の形態の説明に何ら限定されるものではなく、特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

【0078】

【発明の効果】

本発明で提供される改変型のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素はグルコースに対する基質特異性が高い。従って、かかる改変型の酵素を利用すれば高い精度でグルコースの定量が行える。

【0079】

10

20

30

40

50

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

(110) AMANO ENZYME INC.

(120) PYRROLOQUINOLINE QUINONE-DEPENDENT GLUCOSE DEHYDROGENASE

(130) PD2-657

(160) 27

(170) PatentIn version 3.1

(210) 1

10

(211) 455

(212) PRT

(213) *Acinetobacter calcoaceticus*

(400) 1

Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Ser

1

5

10

15

20

Phe Asp Lys Lys Val Leu Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu

20

25

30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly

35

40

45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe

50

55

60

30

Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu

65

70

75

80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Val

85

90

95

40

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn

100

105

110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ala Thr Asp Thr Leu

115

120

125

Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His

130

135

140

10

Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr

145

150

155

160

Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn

165

170

175

20

Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Ser Gly Lys Asp Tyr

180

185

190

His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile

195

200

205

30

Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Ile Ser His Ile Tyr Thr

210

215

220

Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys

225

230

235

240

Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu

245

250

255

40



Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys  
 260 265 270

Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ser Asn Lys  
 275 280 285

Ala Gln Ile Lys Asp Leu Gly Gln Asn Gly Leu Lys Val Ala Ala Gly  
 290 295 300

10

Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro  
 305 310 315 320

Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp  
 325 330 335

20

Pro Thr Cys Gly Asp Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro  
 340 345 350

Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Ser Gly Trp  
 355 360 365

30

Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg  
 370 375 380

Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Ala Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro  
 385 390 395 400

40

Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp

405

410

415

Gly Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ser Gly Asn Val Gln Lys

420

425

430

Asp Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile

435

440

445

10

Lys Phe Thr Tyr Lys Ala Lys

450

455

(210) 2

(211) 1368

(212) DNA

20

(213) *Acinetobacter calcoaceticus*

(400) 2

gatgttctc ttacaccaic tcaatttgc aaagcgaaaa cagaaagcti tgacaagaaa 60  
 gttcttctat ctaatttaaa taagccacat gctttgtgti gggggcciga taatcaaat 120  
 tggtaacgg agcgggcaac aggaagatt ciaagagiga atccagagtc gggcagtgia 180  
 aaaacagitt ticaggttcc tgagattgta aatgatgcig atggacaaa cggtttatg 240  
 ggtttgcct ttaacciga ctttaaaaat aatcttata tctagtitt aggtacttt 300  
 aaaaatccga aatctacaga taaagaatta ccgaatcaaa ctattattcg tcatatacc 360  
 tataacaaag caacagatac tcttgagaaa ccagtagati tattagcagg attacettca 420  
 tcaaaagacc atcagtcggg tcgcttgc attggtccag accaaaagat ttactatacg 480  
 attggtgatc agggcgtaa ccagciggt tatttatct taccaaatca agcacagcat 540  
 acgccgactc aacaggaaat gagcggcaaa gactatcata cctatatggg taaagtatt 600  
 cgcitaaatc tggatggaag tattccaaa gataatcaa gcittaacgg tgaattagc 660  
 catatttata cgcicggta tcgtaatca caggcttgg catttactcc aaatggtaaa 720  
 ctgttgaat cigaacagg tccaaactct gacgatgaaa ttaacctcat tgicaaagt 780

30

40

ggtaaciatg gctggcctaaa tctagcgggt tataaagaig atagiggita tgcctatgca 840  
 aattatcgg cagcaagcaa taaagcacia attaaagatt taggacaaaa tggtttaaaa 900  
 gggcagcig gggitccagt gactaaagag tcigaatgga ctggtaaaaa ctigtaccg 960  
 ccgttaaaaa ctittatatac cgtccaagat acctataact ataatgacce aacctgtggg 1020  
 gatagacct acatttgcig gccaacgggt gcgccgical cgcctatgt ctataaggga 1080  
 ggcaaaaaag caatttcig tgggaaaat acctatagg tccatcttt aaagcgggt 1140  
 gttatticc gtattaaget agatccaact tacagtgeta ctatgatga tgcgtgccc 1200  
 atgtttaaga gcaacaatcg ttatcgigac gtagtgcaa gtccagatgg aaatgttta 1260  
 taigtatga cgtatcttc cggaaatgc caaaaagaig atggttcgt aacgaatata 1320  
 ttgaaaaace caggatctct cattaagttc acctataagg ctatgaa 1368

10

(210) 3

(211) 480

(212) PRT

20

(213) *Acinetobacter calcoaceticus*

(400) 3

Met Asn Lys His Leu Leu Ala Lys Ile Thr Leu Leu Gly Ala Ala Gln  
 1 5 10 15

Leu Leu Thr Leu Asn Ser Ala Phe Ala Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser  
 20 25 30

30

Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Ser Phe Asp Lys Lys Val Leu Leu  
 35 40 45

Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln  
 50 55 60

40

Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro

65	70	75	80
Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe Gln Val Pro Glu Ile Val Asn			
	85	90	95
Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu Gly Phe Ala Phe His Pro Asp			
	100	105	110
Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Val Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro			
	115	120	125
Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr			
	130	135	140
Thr Tyr Asn Lys Ala Thr Asp Thr Leu Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu			
	145	150	155
Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile			
	165	170	175
Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn			
	180	185	190
Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn Gln Ala Gln His Thr Pro Thr			
	195	200	205
Gln Gln Glu Leu Ser Gly Lys Asp Tyr His Thr Tyr Met Gly Lys Val			
	210	215	220

10

20

30

40

Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe  
 225 230 235 240

Asn Gly Val Ile Ser His Ile Tyr Thr Leu Gly His Arg Asn Pro Gln  
 245 250 255

Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly  
 260 265 270

10

Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr  
 275 280 285

Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr  
 290 295 300

20

Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ser Asn Lys Ala Gln Ile Lys Asp Leu Gly  
 305 310 315 320

Gln Asn Gly Leu Lys Val Ala Ala Gly Val Pro Val Thr Lys Glu Ser  
 325 330 335

30

Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr  
 340 345 350

Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro Thr Cys Gly Asp Met Thr  
 355 360 365

Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Lys  
 370 375 380

40

Gly Gly Lys Lys Ala Ile Ser Gly Trp Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro  
 385 390 395 400

Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr  
 405 410 415

Ser Ala Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg  
 420 425 430

Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly Asn Val Leu Tyr Val Leu  
 435 440 445

Thr Asp Thr Ser Gly Asn Val Gln Lys Asp Asp Gly Ser Val Thr Asn  
 450 455 460

Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys Phe Thr Tyr Lys Ala Lys  
 465 470 475 480

(210) 4

(211) 1443

(212) DNA

(213) *Acinetobacter calcoaceticus*

(400) 4

atgaataaac atttattggc taaaattact ttattaggcg ctgctcagct acttacgctc	60
aattcagcat ttgctgatgt tectcttaca ccatctcaat ttgctaaagc gaaaacagaa	120
agctttgaca agaaagtict tctatctaat tttaaataagc cacatgcitt gtgtgtgggg	180
cctgataatc aaatttgggt aacggagcgg gcaacagggc agattctaag agtgaatcca	240
gagtcggcga gigtaaaaac agittttcag gttcttgaga ttgtaaatga tgcgataga	300

10

20

30

40

caaaacgggtt tatiggggtt tgcctttcat cctgacttta aaaataatcc ttataictat 360  
 gtttcaggta cttttaaaaa tccgaaatct acagataaag aattaccgaa tcaaactatt 420  
 attcgtcgat atacctataa caaagcaaca gatactcttg agaaaccagt agatttatta 480  
 gcaggattac cttcatcgaa agaccatcag tccggctgccc ttgcatctgg tccagaccaa 540  
 aagatttact atacgattgg tcatcagggg cgtaaccagc iggcctatct atcttiacca 600  
 aatcaagcac agcatagccc gactcaacag gaactgagcg gcaaagacta tcatacctat 660  
 atgggtaaag tattacgctt aatctggat ggaagtattc caaaagataa tccaagcttt 720  
 aacgggttaa ttagecatai ttatacgttc ggicategta atccacaggg ctggcattt 780  
 actccaaatg gtaaacgttt gcaatcigaa cagggtccaa actcigacga tgaatitaac 840  
 ctcatctgca aagggtgtta ctatggctgg ccaaatgtag cgggttataa agatgatagt 900  
 ggttatgctt atgcaaatia ttccgcagca agcaataaag cacaatitaa agatttagga 960  
 caaaatgggt taaaagtggc agctggcggt ccagtgacta aagagctga atggactggt 1020  
 aaaaactttg taccgccgtt aaaaacttia tataccgicc aagatacctt taactataat 1080  
 gacccaacct gtggggatat gacctacatt tgcctggcaa cggttgcgcc gtcactctgt 1140  
 tatgtctata agggaggcaa aaaagcaatt tctggttggg aaaataacct attggttcca 1200  
 tctttaaagc ggggtgttat ttccgtatt aagctagatc caacttacag tgcacttat 1260  
 gatgatctg tgcgatgtt taagagcaac aatcgttatc gtagctgat tccaagtcca 1320  
 gatggaaatg ttttatatgt attgactgat acttccgga aatgccaaaa agatgatggt 1380  
 tctgtaacga atacattaga aaaccagga tctctatta agttacctt taaggctaag 1440  
 taa 1443

10

20

30

(210) 5

(211) 21

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer

(400) 5

acaaatcata tagagaactc g

21

40

(210) 6  
 (211) 40  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (220)  
 (223) Description of Artificial Sequence : antisense primer 10  
 (400) 6  
 ttacttagcc ttataggga acitaatgag agatcctggg 40

(210) 7  
 (211) 48  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence 20  
 (220)  
 (223) Description of Artificial Sequence : sense primer  
 (400) 7  
 gcggccgca attcatgaat aaacatttat tggctaaaat tactttat 48

(210) 8  
 (211) 57 30  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (220)  
 (223) Description of Artificial Sequence : antisense primer  
 (400) 8  
 gcggccgct gcagctatta cttagcccta taggtgaact taatgagaga tcttggg 57

(210) 9 40



(211) 24

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer

(400) 9

tcacatgttc tticctgcgt tacc

24

10

(210) 10

(211) 46

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : antisense primer

20

(400) 10

atggtgatgg tgaaggtagc tagccctata gggaaccta atgaga

46

(210) 11

(211) 42

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

30

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : antisense primer

(400) 11

gcggccgctt gcagctatta atggtgatgg tgcctagcct ta

42

(210) 12

(211) 23

40

(212) DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : antisense primer

<400> 12

ggcgctact atggttgcct tga

23

<210> 13

10

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/G100-F

<220>

<221> misc\_feature

20

<222> (16)..(18)

<223> n stands for any base

<400> 13

gtaatgatg ctgatnnca aaacggitta ttggg

35

<210> 14

30

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : antisense primer GDHB/G100-R

<220>

<221> misc\_feature

40

<222> (18)..(20)

<223> n stands for any base

<400> 14

cccaataaac cgttttgnnn atcagcatca ttac

35

<210> 15

<211> 38

10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/G320-F

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(18)

20

<223> n stands for any base

<400> 15

caaattaaag atttannnca aaatgggtta aaagtggc

38

<210> 16

<211> 38

30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence : antisense primer GDHB/G320-R

<220>

<221> misc\_feature

<222> (21)..(23)

40

<223> n stands for any base

(400) 16

gccacttita aaccatttg nntaaatct ttaattg

38

(210) 17

(211) 33

(212) DNA

10

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/M367-P

(220)

(221) misc\_feature

(222) (16)..(18)

(223) n stands for any base

20

(400) 17

ccaaccigtg gggatnnac ctacattgc tgg

33

(210) 18

(211) 33

(212) DNA

30

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : antisense primer GDHB/M367-R

(220)

(221) misc\_feature

(222) (16)..(18)

(223) n stands for any base

40

(400) 18

ccagcaaatg taggtinnat cccacaggt tgg

33

(210) 19

(211) 33

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

10

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/A376-F

(220)

(221) misc\_feature

(222) (11)..(13)

(223) n stands for any base

20

(400) 19

gccaacgggt nnnccgtcat ctgcttaigt cta

33

(210) 20

(211) 33

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

30

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/A376-R

(220)

(221) misc\_feature

(222) (21)..(23)

(223) n stands for any base

40

(400) 20

tagacataag cagaigacgg nnaaccggt ggc

33

(210) 21

(211) 33

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

10

(223) Description of Artificial Sequence : antisense primer GDHB/Q193-F

(220)

(221) misc\_feature

(222) (16)..(18)

(223) n stands for any base

(400) 21

20

gacaggggc gtaacnnct ggcttatita ttc

33

(210) 22

(211) 33

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

30

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/Q193-F

(220)

(221) misc\_feature

(222) (16)..(18)

(223) n stands for any base

(400) 22

40

gaataaataa gccagnnngt tacgccccig atc

33

(210) 23  
 (211) 33  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (220)  
 (223) Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/L194-F 19  
 (220)  
 (221) misc\_feature  
 (222) (14)..(16)  
 (223) n stands for any base  
  
 (400) 23  
 gggcgtaac cagnnngctt atttattctt acc 33 20  
  
 (210) 24  
 (211) 33  
 (212) DNA  
 (213) Artificial Sequence  
 (220)  
 (223) Description of Artificial Sequence : antisense primer GDHB/L194-R 30  
 (220)  
 (221) misc\_feature  
 (222) (18)..(20)  
 (223) n stands for any base  
  
 (400) 24  
 ggtaagaata aataagcnnn ctggttacgc ccc 33 40

(210) 25

(211) 37

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : sense primer GDHB/W372-P

(220)

10

(221) misc\_feature

(222) (20)..(22)

(223) n stands for any base

(400) 25

ggatgatgacc tacatttgcg nccaacggg tgcgccg

37

20

(210) 26

(211) 37

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : antisense primer GDHB/W372-R

(220)

30

(221) misc\_feature

(222) (16)..(18)

(223) n stands for any base

(400) 26

cggcgcaacc gtgggungc aaatgtagg cataacc

37

40

(210) 27



(211) 35

(212) DNA

(213) Artificial Sequence

(220)

(223) Description of Artificial Sequence : antisense primer

(400) 27

aagaataaat aagccagtig gttacgcccc tgate

35

10

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1はアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子の配列 (シグナル領域は含まない) 及びアミノ酸配列 (シグナル領域は含まない) を示した図である。

【図2】図2はアシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) 由来のピロロキノリンキノン依存性グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子の配列 (シグナル領域を含む) 及びアミノ酸配列 (シグナル領域を含む) を示した図である。 20

【図3】図3は実施例において使用される発現ベクター pUK-GDHB (S) の構造を示す図である。

【図4】図4は実施例におけるミューテーションスクランブリングで用いたプライマー及び増幅部位を示した表である。

【図5】図5はミューテーションスクランブリングにおける各DNA断片の混合比率を示した表である。設定バイアス率を0.8 : G75, G295, M342, A351, 0.5 : Q168, L169, W347とした。尚、バイアス率とは、あるアミノ酸置換がMutation Scrambling法によって導入される確率である。 30

【図6】図6は実施例のミューテーションスクランブリングによって得られた各種の改変型PQQGDHのアミノ酸置換位置、及び基質特異性をまとめた表である。

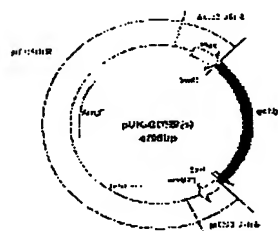
【图 1】

The following table shows the results of the 2010 Census for the United States, broken down by race and ethnicity. The data is presented in a table with 10 columns: Race, Hispanic or Latino, White, Black or African American, Asian, American Indian or Alaska Native, Native Hawaiian or Other Pacific Islander, Two or more races, and Total. The rows represent different racial and ethnic groups. The data is presented in a table with 10 columns: Race, Hispanic or Latino, White, Black or African American, Asian, American Indian or Alaska Native, Native Hawaiian or Other Pacific Islander, Two or more races, and Total. The rows represent different racial and ethnic groups.

【图2】

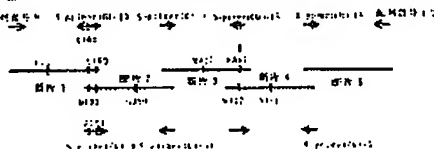
12345678910111213141516171819202122232425262728293031323334353637383940414243444546474849505152535455565758596061626364656667686970717273747576777879808182838485868788899091929394959697989910010110210310410510610710810911011111211311411511611711811912012112212312412512612712812913013113213313413513613713813914014114214314414514614714814915015115215315415515615715815916016116216316416516616716816917017117217317417517617717817918018118218318418518618718818919019119219319419519619719819920020120220320420520620720820921021121221321421521621721821922022122222322422522622722822923023123223323423523623723823924024124224324424524624724824925025125225325425525625725825926026126226326426526626726826927027127227327427527627727827928028128228328428528628728828929029129229329429529629729829930030130230330430530630730830931031131231331431531631731831932032132232332432532632732832933033133233333433533633733833934034134234334434534634734834935035135235335435535635735835936036136236336436536636736836937037137237337437537637737837938038138238338438538638738838939039139239339439539639739839940040140240340440540640740840941041141241341441541641741841942042142242342442542642742842943043143243343443543643743843944044144244344444544644744844945045145245345445545645745845946046146246346446546646746846947047147247347447547647747847948048148248348448548648748848949049149249349449549649749849950050150250350450550650750850951051151251351451551651751851952052152252352452552652752852953053153253353453553653753853954054154254354454554654754854955055155255355455555655755855956056156256356456556656756856957057157257357457557657757857958058158258358458558658758858959059159259359459559659759859960060160260360460560660760860961061161261361461561661761861962062162262362462562662762862963063163263363463563663763863964064164264364464564664764864965065165265365465565665765865966066166266366466566666766866967067167267367467567667767867968068168268368468568668768868969069169269369469569669769869970070170270370470570670770870971071171271371471571671771871972072172272372472572672772872973073173273373473573673773873974074174274374474574674774874975075175275375475575675775875976076176276376476576676776876977077177277377477577677777877978078178278378478578678778878979079179279379479579679779879980080180280380480580680780880981081181281381481581681781881982082182282382482582682782882983083183283383483583683783883984084184284384484584684784884985085185285385485585685785885986086186286386486586686786886987087187287387487587687787887988088188288388488588688788888989089189289389489589689789889990090190290390490590690790890991091191291391491591691791891992092192292392492592692792892993093193293393493593693793893994094194294394494594694794894995095195295395495595695795895996096196296396496596696796896997097197297397497597697797897998098198298398498598698798898999099199299399499599699799899910001001100210031004100510061007100810091010101110121013101410151016101710181019102010211022102310241025102610271028102910301031103210331034103510361037103810391040104110421043104410451046104710481049105010511052105310541055105610571058105910601061106210631064106510661067106810691070107110721073107410751076107710781079108010811082108310841085108610871088108910901091109210931094109510961097109810991100110111021103110411051106110711081109111011111112111311141115111611171118111911201121112211231124112511261127112811291130113111321133113411351136113711381139114011411142114311441145114611471148114911501151115211531154115511561157115811591160116111621163116411651166116711681169117011711172117311741175117611771178117911801181118211831184118511861187118811891190119111921193119411951196119711981199120012011202120312041205120612071208120912101211121212131214121512161217121812191220122112221223122412251226122712281229123012311232123312341235123612371238123912401241124212431244124512461247124812491250125112521253125412551256125712581259126012611262126312641265126612671268126912701271127212731274127512761277127812791280128112821283128412851286128712881289129012911292129312941295129612971298129913

【图 3】



【图4】

AF012792.1	hsp70	hsp70
AF012793.1	hsp70	hsp70
AF012794.1	hsp70	hsp70
AF012795.1	hsp70	hsp70
AF012796.1	hsp70	hsp70
AF012797.1	hsp70	hsp70
AF012798.1	hsp70	hsp70
AF012799.1	hsp70	hsp70
AF012800.1	hsp70	hsp70
AF012801.1	hsp70	hsp70
AF012802.1	hsp70	hsp70
AF012803.1	hsp70	hsp70
AF012804.1	hsp70	hsp70
AF012805.1	hsp70	hsp70
AF012806.1	hsp70	hsp70
AF012807.1	hsp70	hsp70
AF012808.1	hsp70	hsp70
AF012809.1	hsp70	hsp70
AF012810.1	hsp70	hsp70
AF012811.1	hsp70	hsp70
AF012812.1	hsp70	hsp70
AF012813.1	hsp70	hsp70
AF012814.1	hsp70	hsp70
AF012815.1	hsp70	hsp70
AF012816.1	hsp70	hsp70
AF012817.1	hsp70	hsp70
AF012818.1	hsp70	hsp70
AF012819.1	hsp70	hsp70
AF012820.1	hsp70	hsp70
AF012821.1	hsp70	hsp70
AF012822.1	hsp70	hsp70
AF012823.1	hsp70	hsp70
AF012824.1	hsp70	hsp70
AF012825.1	hsp70	hsp70
AF012826.1	hsp70	hsp70
AF012827.1	hsp70	hsp70
AF012828.1	hsp70	hsp70
AF012829.1	hsp70	hsp70
AF012830.1	hsp70	hsp70
AF012831.1	hsp70	hsp70
AF012832.1	hsp70	hsp70
AF012833.1	hsp70	hsp70
AF012834.1	hsp70	hsp70
AF012835.1	hsp70	hsp70
AF012836.1	hsp70	hsp70
AF012837.1	hsp70	hsp70
AF012838.1	hsp70	hsp70
AF012839.1	hsp70	hsp70
AF012840.1	hsp70	hsp70
AF012841.1	hsp70	hsp70
AF012842.1	hsp70	hsp70
AF012843.1	hsp70	hsp70
AF012844.1	hsp70	hsp70
AF012845.1	hsp70	hsp70
AF012846.1	hsp70	hsp70
AF012847.1	hsp70	hsp70
AF012848.1	hsp70	hsp70
AF012849.1	hsp70	hsp70
AF012850.1	hsp70	hsp70
AF012851.1	hsp70	hsp70
AF012852.1	hsp70	hsp70
AF012853.1	hsp70	hsp70
AF012854.1	hsp70	hsp70
AF012855.1	hsp70	hsp70
AF012856.1	hsp70	hsp70
AF012857.1	hsp70	hsp70
AF012858.1	hsp70	hsp70
AF012859.1	hsp70	hsp70
AF012860.1	hsp70	hsp70
AF012861.1	hsp70	hsp70
AF012862.1	hsp70	hsp70
AF012863.1	hsp70	hsp70
AF012864.1	hsp70	hsp70
AF012865.1	hsp70	hsp70
AF012866.1	hsp70	hsp70
AF012867.1	hsp70	hsp70
AF012868.1	hsp70	hsp70
AF012869.1	hsp70	hsp70
AF012870.1	hsp70	hsp70
AF012871.1	hsp70	hsp70
AF012872.1	hsp70	hsp70
AF012873.1	hsp70	hsp70
AF012874.1	hsp70	hsp70
AF012875.1	hsp70	hsp70
AF012876.1	hsp70	hsp70
AF012877.1	hsp70	hsp70
AF012878.1	hsp70	hsp70
AF012879.1	hsp70	hsp70
AF012880.1	hsp70	hsp70
AF012881.1	hsp70	hsp70
AF012882.1	hsp70	hsp70
AF012883.1	hsp70	hsp70
AF012884.1	hsp70	hsp70
AF012885.1	hsp70	hsp70
AF012886.1	hsp70	hsp70
AF012887.1	hsp70	hsp70
AF012888.1	hsp70	hsp70



【図 6】

[illegible]

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	9/04	G 0 1 N	33/66	C
G 0 1 N	33/66	C 1 2 N	5/00	A
// C 1 2 Q	1/54	C 1 2 Q	1/54	
(C 1 2 N	9/04	C 1 2 N	9/04	D
C 1 2 R	1:01 )	C 1 2 R	1:01	
(C 1 2 Q	1/54	C 1 2 Q	1/54	
C 1 2 R	1:01 )	C 1 2 R	1:01	

F ターム (参考) 2G045 AA13 BA11 CA26 DA31 FB01

4B024 AA01 AA11 BA08 CA04 CA06 DA02 DA05 DA06 DA11 DA12

EA04 GA11

4B050 CC03 CC04 DD02 LL03

4B063 QA19 QQ03 QQ24 QS02 QX02

4B065 AA01X AA04Y AA57X AA72X AA90X AB01 BA02 CA28 CA46

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**